Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H. E. Bock

Adsorption von Insulinen verschiedener Spezies an Elektrophoresepapier

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Bernd Manfred Müller
aus Reutlingen

1969

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543901_0042

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H. E. Bock

Adsorption von Insulinen verschiedener Spezies an Elektrophoresepapier

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Bernd Manfred Müller
aus Reutlingen

1969

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. J. Hirschmann

1. Berichterstatter: Professor Dr. E. Kallee
(Professor Dr. Dr. h.c. H.E. Bock)

2. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. G. Weitzel

Fotodruck PRÄZIS Barbara v. Spangenberg KG · Tübingen

INHALT

	Seite
Einleitung	1
Methoden	4
Ergebnisse	10
Abbildungen	16
Tabellen	17
Statistik	22
Diskussion	23
Zusammenfassung	26
Literaturverzeichnis	29

EINLEITUNG

Unter der Behandlung des Diabetes mellitus mit Insulin werden bei nahezu allen Patienten Antikörper gegen heterologe und homologe Insuline gebildet (LOCKWOOD u. PROUT, 1962; BRUNFELDT u. DECKERT, 1964; RENOLD et al., 1963).

Die Antigenität von Insulinen verschiedener Spezies beruht neben Unterschieden in der Primärstruktur wahrscheinlich auch auf Veränderungen der Sekundär- und Tertiärstruktur bei der Isolierung (Lit.-Übersicht bei PFEIFFER, 1967). Außerdem wird gegen ein Insulin-Antigen nicht nur ein Antikörper gebildet, sondern es treten mehrere Antikörper hintereinander oder gleichzeitig auf (ARQUILLA u. FINN, 1963; FEDERLIN et al., 1966). Vermutlich reagieren die einzelnen Individuen auf mehrere antigenetische Determinanten des Insulins, was sich in einer multiplen Antikörperproduktion äußert.

Der Nachweis von Insulinantikörpern erfolgt mit biologischen, immunologischen und physiko-chemischen Methoden (Lit.-Übersichten bei DECKERT, 1964; PFEIFFER et al., 1969; GRIMMINGER u. KALLEE, 1969). Die schon lange vermuteten humoralen, nichtpräzipitierenden Insulinantikörper (BANTING et al., 1938) konnten BERSON u. YALOW 1956 sowie PETERS et al. im gleichen Jahr erstmals direkt sichtbar machen. Es stellte sich heraus, daß radiojodiertes Insulin im Serum von insulinbehandelten Patienten, insbesondere bei der Insulinresistenz, an γ-Globuline reversibel adsorbiert wird. Die von beiden Arbeitsgruppen angewandte Methode ist auf einem von KALLEE 1952 angegebenen papierelektrophoretischen Insulin-

nachweis aufgebaut: ^{131}J-Insulin, das vollständig an Zellulose adsorbiert ist, kann nur durch Insuline vollständig, durch andere Proteine nur teilweise desorbiert werden. Eine Ausnahme bilden insulinbindende Antikörper (BERSON et al., 1956; PETERS et al., 1956; BURROWS et al., 1957). Diese besitzen eine noch höhere spezifische Affinität zu Insulinen als das Elektrophoresepapier. Humorale Insulinantikörper binden nicht nur das Insulin, gegen das eine Sensibilisierung eingetreten ist; vielmehr lassen sich immunologische Kreuzreaktionen mit Insulinen zahlreicher heterologer Spezies durchführen (Lit.-Übersicht bei SCHWICK, 1966). Die heterologen Insuline werden zwar im allgemeinen schwächer adsorbiert als das Insulin der homologen Spezies, das die Antikörperbildung induziert hat. Jedoch läßt sich wegen der Reversibilität der Antigenbindung homologes durch heterologes Insulin aus den haptophoren Gruppen des Antikörpers verdrängen.

KERP et al. haben 1966 ein Verfahren entwickelt, bei dem mittels Zelluloseadsorption der Titer von ^{131}J-Insulin-bindenden Antikörpern bestimmt werden kann: Das von den Antikörpern nicht mehr gebundene ^{131}J-Insulin wird an Zellulosepulver adsorbiert, ähnlich wie bei der Papierelektrophorese. Analog zu den elektrophoretischen Methoden läßt sich das KERPsche Verfahren auch zur quantitativen Insulinbestimmung verwenden. Zum Nachweis von Insulin-Antikörpern mit Methoden, bei denen die Adsorption an Zellulose eine Rolle spielt, kann sowohl ^{131}J-Rinder-Insulin als auch ^{131}J-Schweine-Insulin verwendet werden. So erhob sich die Frage, ob Schweine-Insulin genau gleich wie Rinder-Insulin an Papier adsorbiert wird. Antikörper sind von vornherein nur gegen eine einzige Gruppe von Antigenen gerichtet. Papier dagegen adsorbiert bei höheren Pro-

teinkonzentrationen nahezu alle Proteine unterschiedslos. Unterhalb einer kritischen Proteinkonzentration läßt sich aber am Papier ein Selektionsphänomen feststellen, das die spezifische Unterscheidung verschiedener Proteinklassen gestattet. Es lag daher nahe, in Analogie zur immunologischen Adsorption, zu prüfen, ob die Selektivität der Papieradsorption bis in den Speziesbereich geht. Besäße Zellulose die Fähigkeit, Insuline verschiedener Spezies mit ähnlicher Spezifität wie ein Antikörper zu diskriminieren, so müßte sich radioaktives Insulin einer Spezies aus der Adsorption an Elektrophoresepapier am stärksten durch nichtradioaktives Insulin der gleichen Spezies verdrängen lassen.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher mit Hilfe der Papierelektrophorese untersucht, ob Insuline verschiedener Spezies adsorbiertes ^{131}J-Rinder- und ^{131}J-Schweine-Insulin qualitativ oder quantitativ verschieden verdrängen können.

METHODEN

A) Insulinlösungen

Die der Papierelektrophorese unterworfenen Insulinlösungen wurden durch Mischen von jeweils gleichen Teilen ^{131}J-Insulin-Stammlösung (Farbwerke Hoechst) mit Speziesinsulin-Stammlösung hergestellt. Damit war gewährleistet, daß markiertes und nichtmarkiertes Insulin gleichzeitig aufgetragen werden konnten.

Albumine und γ-Globuline vom Menschen und Rind wurden den ^{131}J-Insulinlösungen in den in Abschnitt II und III angegebenen Mengen zugefügt.

Für die Versuche mußten mehrere Chargen ^{131}J-Rinder- und ^{131}J-Schweine-Insulin verwendet werden. Die einzelnen Chargen unterschieden sich in Insulinkonzentration und spezifischer Aktivität nur geringgradig. Deutliche Unterschiede ergaben sich aber in der Angabe des Herstellers über die Adsorbierbarkeit an Zellulose (92...97 %).

I. Stammlösungen der vier Speziesinsuline

10 mg Speziesinsulin (Insuline vom Pferd, Rind, Schwein und Schaf; 10mal umkristallisiert; Firma NOVO, Kopenhagen) wurden zunächst in 2 ml n/100 HCl gelöst, dann wurden 6 ml eines frisch angesetzten Phosphatpuffers (p_H 7,4) und schließlich 2 ml n/100 NaOH hinzugegeben. Von den 10 ml Insulinlösung wurden Portionen zu 0,5 ml

in Kunststoffgefäße abgefüllt und bis zur Verwendung eingefroren. Eine halbe Stunde vor jedem Versuch wurden 50 µl von jeder der vier Insulin-Stammlösungen (1 µg/µl) mit 50 µl einer der beiden ^{131}J-Insulin-Stammlösungen gemischt.

II. ^{131}J-Rinder-Insulin-Stammlösungen

Es wurde ^{131}J-Rinder-Insulin ("isotone Lösung zur Injektion", Farbwerke Hoechst, Frankfurt) in zehnfacher Verdünnung verwendet. Durchschnittlich betrug die spezifische Aktivität 10 mCi ^{131}J/mg Insulin, die Insulinkonzentration etwa 3 µg Insulin/ml.

Entsprechend den verfügbaren ^{131}J-Insulinlösungen wurden Albumin und γ-Globulin vom Menschen und Rind in solchen Mengen zugefügt, daß sich ^{131}J-Insulin-Stammlösungen vom Rind mit folgenden Proteinkonzentrationen ergaben:

a) ohne Proteinzusatz	(RI)
b) 0,25 % Human-Albumin	(RI-HA)
c) 0,25 % Rinder-Albumin	(RI-RA)
d) 0,25 % Human-γ-Globulin	(RI-HG)
e) 0,25 % Rinder-γ-Globulin	(RI-RG)
f) 0,50 % Rinder-Albumin	(RI-5)
g) 0,75 % Rinder-Albumin	(RI-75)

III. ^{131}J-Schweine-Insulin-Stammlösungen

Während ^{131}J-Rinder-Insulin vom Hersteller ohne Proteinzusatz geliefert wurde, enthielt ^{131}J-Schweine-Insulin schon ab Werk 0,50 % Rinder-Albumin.

^{131}J-Schweine-Insulin ("für immunologische Bestimmungen", Farbwerke Hoechst) wies eine spezifische Aktivität von durchschnittlich 186 mCi ^{131}J/mg Insulin auf bei einer Insulinkonzentration von ca. 10 µg Insulin/ml.

Durch Zugabe von Albumin und γ-Globulin vom Menschen und Rind wurden ^{131}J-Schweine-Insulin-Stammlösungen mit folgenden Proteinkonzentrationen hergestellt:

a)	0,50 % Rinder-Albumin	(SI)
b)	0,50 % Rinder-Albumin 0,25 % Human-Albumin	(SI-HA)
c)	0,75 % Rinder-Albumin	(SI-RA)
d)	0,50 % Rinder-Albumin 0,25 % Human-γ-Globulin	(SI-HG)
e)	0,50 % Rinder-Albumin 0,25 % Rinder-γ-Globulin	(SI-RG)

B) Elektrophorese

Die papierelektrophoretische Auftrennung erfolgte mit einer LKB-Apparatur über 18 Stunden bei einer Raumtemperatur von 18...23° C. Die Stromstärke stieg für 8 Papierstreifen (Papier Nr. 214, Firma Macherey & Nagel, Düren) von anfänglich 11...12 mA auf 17...19 mA bei einem Spannungsabfall von 100 V auf 95 V. Ohne Berücksichtigung des Spannungsverlustes stieg die Stromstärke pro Streifen von durchschnittlich 1,45 mA auf 2,25 mA.

Der Veronal-Na-Acetat-Puffer (Ionenstärke 0,1) war auf einen p_H-Wert von 8,6 eingestellt. Pro Elektrophoresekammer wurden 2 Liter verwendet. Um Dochteffekten vorzubeugen, wurde eine Stunde lang äquilibriert. Vor dem Aufbringen der Insulinlösungen wurden die Papierstreifen mit Pufferlösung durch-

tränkt und anschließend zwischen Filterpapier gelegt, um überschüssige Pufferlösung abzusaugen.

Pro Papierstreifen wurden mit einer Konstriktions-Mikropipette (H. E. Pedersen, Kopenhagen) im Abstand von 1,5 cm jeweils 5 µl der Lösung, die durch Mischen der beiden Insulin-Stammlösungen entstand, aufgetragen. Um annähernd gleichgroße Auftragspunkte zu erhalten, wurde die Pipette nicht ausgeblasen, sondern sorgfältig mit der Spitze auf das Papier gesetzt, damit die Insulinlösung langsam vom Papier aufgesogen werden konnte. Nach 18-stündiger Gleichstromeinwirkung wurden die Streifen aus den Kammern genommen und bei 120° C ca. 30 Minuten lang getrocknet.

5 µl Insulinlösung enthielten (entsprechend der Mischung aus der ^{131}J-markierten Insulin-Stammlösung mit oder ohne Proteinzusatz und der jeweiligen Speziesinsulin-Stammlösung bei den Versuchen mit

a) ^{131}J-Rinder-Insulin:

2 500 ng des jeweiligen Speziesinsulins und 2,5 ng ^{131}J-Rinder-Insulin (Radioaktivitätskonz. 7,5 nCi/5 µl) bei folgenden Albumin- oder γ-Globulin-Konzentrationen:

	Albumin		γ-Globulin	
	Mensch	Rind	Mensch	Rind
RI	-	-	-	-
RI-HA	6,25 µg	-	-	-
RI-RA	-	6,25 µg	-	-
RI-HG	-	-	6,25 µg	-
RI-RG	-	-	-	6,25 µg
RI-5	-	12,50 µg	-	-
RI-75	-	18,75 µg	-	-

b) ^{131}J-Schweine-Insulin:

2 500 ng des jeweiligen Speziesinsulins und 0,25 ng ^{131}J-Schweine-Insulin (Radioaktivitätskonzentration 47 nCi pro 5/ul) bei folgenden Albumin- oder γ-Globulin-Konzentrationen:

	Albumin		γ-Globulin	
	Mensch	Rind	Mensch	Rind
SI	-	12,50/ug	-	-
SI-HA	6,25/ug	12,50/ug	-	-
SI-RA	-	18,75/ug	-	-
SI-HG	-	12,50/ug	6,25/ug	-
SI-RG	-	12,50/ug	-	6,25/ug

C) Zusammenfassung über die Kennzeichnung der Versuchsgruppen und Versuchsreihen.

Die Versuche lassen sich zunächst in zwei Gruppen (Hauptversuche) unterteilen:
a) Versuche mit ^{131}J-Rinder-Insulin-Stammlösung (RI),
b) Versuche mit ^{131}J-Schweine-Insulin-Stammlösung (SI).

Die Hauptversuche werden in Versuchsreihen gegliedert, je nachdem ob die beiden ^{131}J-Insulin-Stammlösungen Human- oder Rinder-Albumin bzw. Human- oder Rinder- γ-Globulin enthalten.

Im Rahmen einer Versuchsgruppe wird die Wirkung von Insulinen verschiedener Spezies (Pferd, Rind, Schwein, Schaf) auf die Adsorption der beiden ^{131}J-Insuline geprüft.

D) Methoden der Auswertung

Mit Hilfe eines Radiopapierchromatographen (Modell LB 242, Firma Berthold, Wildbad) wurde die Radioaktivität auf den Papierstreifen bei einer Impulsrate von 30... 100/sec., einer Blende von 3 mm Breite und 36 mm Länge und einer Vorschubgeschwindigkeit von 600 mm/h ausgezählt.

Nach der radiopapierchromatographischen Auswertung wurden die Papierstreifen auf Röntgenfilme geklebt, die je nach der aktuellen Aktivität der ^{131}J-Insuline nach 8...24 Stunden entwickelt wurden.

Albumine und γ-Globuline vom Menschen und Rind wurden mit Amidoschwarz 10 B in Methanol-Eisessig gefärbt.

ERGEBNISSE

1. Verhalten der beiden ^{131}J-Insulin-Stammlösungen ohne Zusatz von Insulinen verschiedener Spezies.

Werden ^{131}J-Insulin-Stammlösungen (15 ng ^{131}J-Rinder-Insulin in 5/ul oder 0,5 ng ^{131}J-Schweine-Insulin und 25/ug Rinder-Albumin in 5/ul) im Verhältnis 1:1 mit Phosphatpuffer (p_H 7,4) verdünnt und auf Papierstreifen der Gleichstromwirkung ausgesetzt, so sind sie sowohl nach 18-stündiger als auch nach 36-stündiger Elektrophoresedauer noch vollständig an der Auftragstelle adsorbiert (Abb. 1). Zugefügtes Albumin oder γ-Globulin vom Menschen oder Rind (6,25/ug/5/ul) ist nicht in der Lage, auch nur einen geringen Teil des radiojodierten Insulins zu desorbieren (Abb.1).

Verdoppelung (15 ng/5/ul) oder Verzehnfachung (75 ng/5/ul) der Konzentration von ^{131}J-Rinder-Insulin und Verdoppelung (0,5 ng Insulin und 25/ug Rinder-Albumin in 5/ul) der Konzentration von ^{131}J-Schweine-Insulin ändern an den oben beschriebenen Ergebnissen nichts. Sie entsprechen auch denen von KALLEE (1952), der feststellte, daß weniger als 3/ug ^{131}J-Insulin auch durch großen Serumüberschuß nicht mehr desorbiert werden können.

2. Verhalten von ^{131}J-Insulin-Stammlösungen bei Zugabe von Pferde-, Rinder-, Schweine- und Schaf-Insulin.

Der alleinige Einfluß verschiedener Insuline auf die Adsorption von radiojodiertem Insulin konnte nur bei ^{131}J-Rinder-

Insulin untersucht werden, da die vom Hersteller gelieferte ^{131}J-Schweine-Insulinlösung bereits 0,5 % Rinder-Albumin enthielt.

^{131}J-Rinder-Insulin wandert ca. 5 mm anodenwärts (Abb. 2), wenn 0,15 µg Tierinsulin gemeinsam mit 7,5 ng ^{131}J-Rinder-Insulin aufgetragen werden. Die Menge an nichtmarkiertem Insulin muß zwanzigmal so groß sein wie die von ^{131}J-Rinder-Insulin, um gerade noch einen Desorptionseffekt zu erhalten. Wird die Konzentration der Tierinsuline verdoppelt (0,30 µg Insulin/5 µl), so wandert ^{131}J-Rinder-Insulin ca. 15 mm weit (Abb. 3). Auf dieser Abbildung ist auch zu erkennen, daß einerseits die Wanderungsstrecke von Rinder- und Schweine-Insulin größer ist als die von Pferde- und Schaf-Insulin, andererseits die Banden von Pferde- und Schaf-Insulin schärfer sind als die von Rinder- und Schweine-Insulin.

Eine Erhöhung der Konzentration der nichtmarkierten Insuline auf 2,5 µg/5 µl (RI) führt, neben der Zunahme der Wanderungsstrecke, zu den gleichen Unterschieden im Adsorptionsmuster der vier Insuline wie bei der Konzentration von 0,30 µg Insulin/5 µl (Abb. 4). Trotz der unterschiedlichen Wanderungsstrecken wird ^{131}J-Rinder-Insulin durch alle vier Insuline gleich stark von der Auftragstelle desorbiert (Tab. 1).

Enthalten 5 µl Auftragslösung neben 7,5 ng ^{131}J-Rinder-Insulin und 2,5 µg Speziesinsulin noch 6,25 µg Albumin vom Menschen (RI-HA) oder Rind (RI-RA), so ergibt sich folgendes:

a) Die Adsorption von ^{131}J-Rinder-Insulin an der Auftragstelle verringert sich bei allen vier Insulinen um durchschnittlich 12 % (Abb. 5 und 8, Tab. 13).

b) Ein Teil des von der Auftragstelle verdrängten ^{131}J-Rinder-Insulins ist mit Albumin gewandert. Bei den Versuchen mit nichtmarkiertem Rinder- und Schweine-Insulin liegt ein größerer Teil des radiojodierten Rinder-Insulins im Bereich der Albumin-Bande als bei den Versuchen mit Pferde- und Schaf-Insulin.

3. Verhalten von ^{131}J-Schweine-Insulin-Stammlösungen nach Zusatz von Pferde-, Rinder-, Schweine- oder Schaf-Insulin.

5/ul ^{131}J-Schweine-Insulin-Stammlösung enthalten neben 0,25 ng ^{131}J-Schweine-Insulin noch 12,5/ug Rinder-Albumin.

Wird im Rahmen einer Versuchsgruppe die Desorbierbarkeit von ^{131}J-Schweine-Insulin durch 0,30/ug Insulin verschiedener Spezies untersucht, so ergeben sich - wie in Abschn. 2 für ^{131}J-Rinder-Insulin beschrieben - für die vier Insuline Wanderungsstrecken von durchschnittlich 15 mm (Abb. 6). Der desorbierende Effekt von Albumin kommt bei einer Insulin-Konzentration von 0,30/ug/5/ul noch kaum zum Tragen. Wird die Konzentration der vier Insuline aber erhöht auf jeweils 2,5/ug/5/ul (SI), dann wandert ein Teil des aus der Adsorption an der Auftragstelle verdrängten ^{131}J-Schweine-Insulins mit dem Albumin (Abb. 7).

4. Vergleich der Adsorptionsmuster von ^{131}J-Rinder-Insulin mit denen von ^{131}J-Schweine-Insulin.

In beiden Hauptversuchen wird durch Zusatz von Insulinen verschiedener Spezies (jeweils 2,5/ug/5/ul) und Albuminen vom Menschen oder Rind (6,25, 12,5 oder 18,75/ug/5/ul) ein Teil des an der Auftragstelle adsorbierten ^{131}J-Insu-

lins verdrängt (Tab. 2,3,6-10). Das desorbierte ^{131}J-Insulin wandert mit Albumin und dem jeweiligen nichtmarkierten Insulin anodenwärts. Dabei verteilt es sich auf der Wanderungsstrecke in einem für die nichtmarkierten Insuline charakteristischen Adsorptionsmuster:

a) Pferde- und Schaf-Insuline wandern langsamer als Rinder- und Schweine-Insuline.

b) Bei den Versuchen mit Rinder- und Schweine-Insulin befindet sich im Bereich der Albumin-Banden ein größerer Teil des desorbierten ^{131}J-Insulins als bei den Versuchen mit Pferde- und Schaf-Insulin (Abb. 5 und 7).

Die unterschiedliche Verteilung der Radioaktivität in den Adsorptionsmustern der vier Insuline ist auf den Autoradiogrammen deutlich zu erkennen (Abb. 5 und 7). Die Trennschärfe des Radiopapierchromatographen reicht jedoch nicht aus, diese Unterschiede auf den Differential- und Integralkurven deutlich wiederzugeben.

5. Ergebnisse über die Adsorption an der Auftragstelle.

Die Ausmessung aller Autoradiogramme (siehe auch Abb. 4,5 und 7) ergab für den Auftragspunkt einen Radius von durchschnittlich 5 mm.

Auf den Kurven des Radiopapierchromatographen wurden die Impulse für die Gesamtaktivität und für die Aktivität am Auftragspunkt gezählt. Unter Berücksichtigung des Nulleffekts wurde der prozentuale Anteil der Aktivität des Auftragspunktes an der Gesamtaktivität bestimmt.
Die Tabellen 1 - 13 geben die Prozentsätze der Aktivitäten der an den Auftragspunkten adsorbierten ^{131}J-Insuline an.

A) Versuche mit ^{131}J-Rinder-Insulin

Es wurden verglichen:

a) innerhalb der Versuchsreihen (Tab. 1-7) die Insuline verschiedener Spezies untereinander;
In der Desorbierbarkeit von ^{131}J-Rinder-Insulin durch die vier Insuline ließen sich keine Unterschiede nachweisen.

b) RI-HA mit RI-RA (Tab. 2 und 3);
Human-Albumin und Rinder-Albumin unterschieden sich in ihrer desorbierenden Wirkung nicht.

c) RI-HG mit RI-RG (Tab. 4 und 5);
Auch zwischen Human-γ-Globulin und Rinder-γ-Globulin konnten keine Unterschiede festgestellt werden.

d) RI mit RI-HG und RI-RG (Tab. 1,4 und 5);
γ-Globulin beeinflußte die Adsorption an der Auftragstelle nicht. Es wanderte keine meßbare Radioaktivität kathodenwärts.

e) RI mit RI-HA und RI-RA (Tab. 1,2 und 3);
6,25 µg Human- oder Rinder-Albumin verminderten die Adsorption von ^{131}J-Rinder-Insulin um durchschnittlich 11 % (Tab. 13).

f) RI mit RI-5 (Tab. 1 und 6);
Wurde die Albuminkonzentration erhöht auf 12,5 µg pro 5 µl, so nahm die Adsorption von radiojodiertem Rinder-Insulin am Auftragspunkt um durchschnittlich 18 % ab (Tab. 13).

g) RI mit RI-75 (Tab. 1 und 7).
Eine weitere Erhöhung der Albuminkonzentration auf 18,75 µg/5 µl hatte offenbar keinen zusätzlichen desorbierenden Effekt auf ^{131}J-Rinder-Insulin, was sich beim Vergleich des Mittelwertes von RI-5 mit dem von RI-75 (Tab. 13) erkennen läßt.

B) Versuche mit ^{131}J-Schweine-Insulin

Es wurden verglichen:

a) innerhalb der Versuchsreihen (Tab. 8-12) die desorbierende Wirkung der Spezies-Insuline untereinander; Es ließen sich keine Unterschiede nachweisen.

b) SI-HA mit SI-RA (Tab. 9 und 10); Human- und Rinder-Albumin unterschieden sich in ihrer desorbierenden Wirkung nicht.

c) SI-HG mit SI-RG (Tab. 11 und 12); Es ließen sich keine Unterschiede nachweisen.

d) SI mit SI-HA und SI-RA (Tab. 8,9 und 10); Aus dem Unterschied von 1,9 % (errechnet aus den Mittelwerten der Versuchsreihen, Tab. 13) ließ sich keine Signifikanz ableiten.

e) SI mit SI-HG und SI-RG (Tab. 8,11 und 12). Es ließen sich keine Unterschiede nachweisen.

C) Vergleich zwischen ^{131}J-Rinder- und ^{131}J-Schweine-Insulin.

Innerhalb der Versuchsgruppen der einzelnen Versuchsreihen ließen sich keine Unterschiede in der desorbierenden Wirkung der vier Insuline auf die ^{131}J-markierten Insuline feststellen. Aus diesem Grunde wurden alle Werte einer Versuchsreihe zu einem für sie charakteristischen Mittelwert zusammengefaßt (Tab. 13). Zwischen Human-Albumin und Rinder-Albumin ließen sich keine Unterschiede in der Wirkung auf adsorbiertes Insulin feststellen. Das gleiche gilt für Human-γ-Globulin und Rinder-γ-Globulin. Deshalb wurden auch die Mittelwerte der Versuchsreihen HA und RA und die der Versuchsreihen HG und RG zusammengefaßt (Tab. 13).

Aus Tabelle 13 und auf Abbildung 8 läßt sich erkennen, daß bei gleichen Konzentrationen von Albumin und nicht-markiertem Insulin ^{131}J-Schweine-Insulin stärker an Elektrophoresepapier adsorbiert wird als ^{131}J-Rinder-Insulin. Da ^{131}J-Schweine-Insulin eine etwa achtzehnmal höhere spezifische Radioaktivität aufweist als ^{131}J-Rinder-Insulin, ist dieser Befund möglicherweise Ausdruck einer radiochemischen Veränderung der Proteinmoleküle infolge Bildung von ^{131}Xe aus ^{131}J (KALLEE, 1965 und 1969).

ABBILDUNGEN

(Originalgröße)

⊕ = Anode, ⊖ = Kathode

Abbildung 1

A) 7,5 ng/5/ul ^{131}J-Rinder-Insulin ohne weiteren Zusatz.
B) 7,5 ng/5/ul ^{131}J-Rinder-Insulin + 6,25/ug/5/ul Human- oder Rinder-Albumin.
C) 7,5 ng/5/ul ^{131}J-Rinder-Insulin + 6,25/ug/5/ul Human- oder Rinder-γ-Globulin.
D) 0,25 ng/5/ul ^{131}J-Schweine-Insulin + 12,5/ug/5/ul Rinder-Albumin.

Abbildung 2

7,5 ng/5/ul ^{131}J-Rinder-Insulin + 150 ng/5/ul Speziesinsulin.

Abbildung 3

7,5 ng/5/ul ^{131}J-Rinder-Insulin + 300 ng/5/ul Speziesinsulin.

Abbildung 1

Abbildung 2

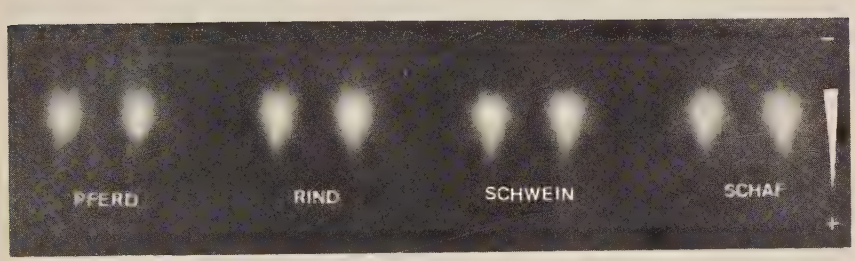


Abbildung 3

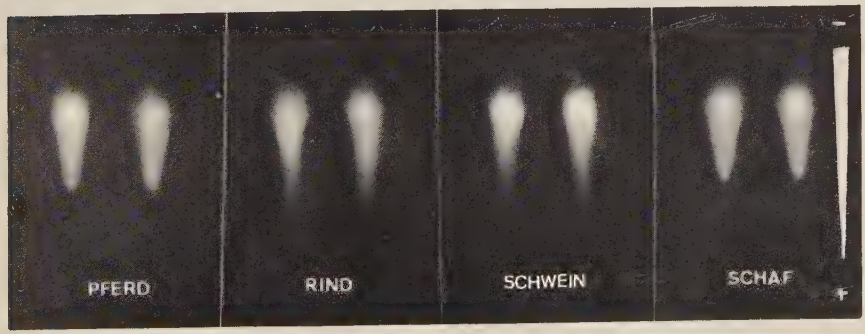


Abbildung 4

7,5 ng ^{131}J-Rinder-Insulin + 2,5 µg Insulin verschiedener Spezies

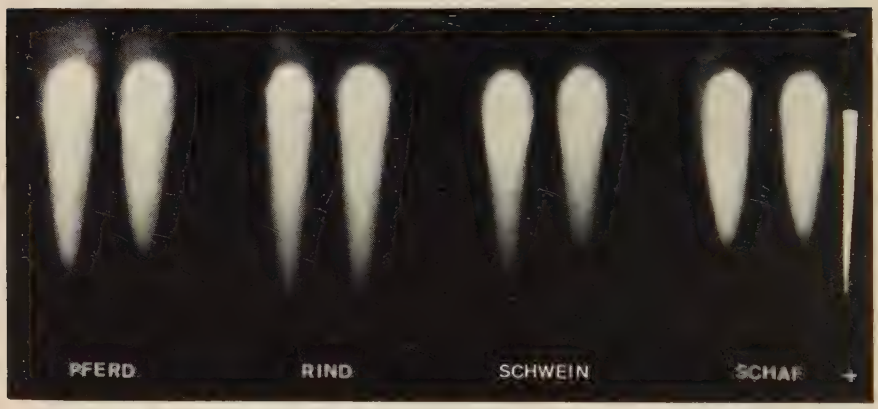


Abbildung 5

7,5 ng ^{131}J-Rinder-Insulin + 2,5 µg Insulin verschiedener Spezies
+ 6,25 µg Rinder-Albumin (RI-RA)

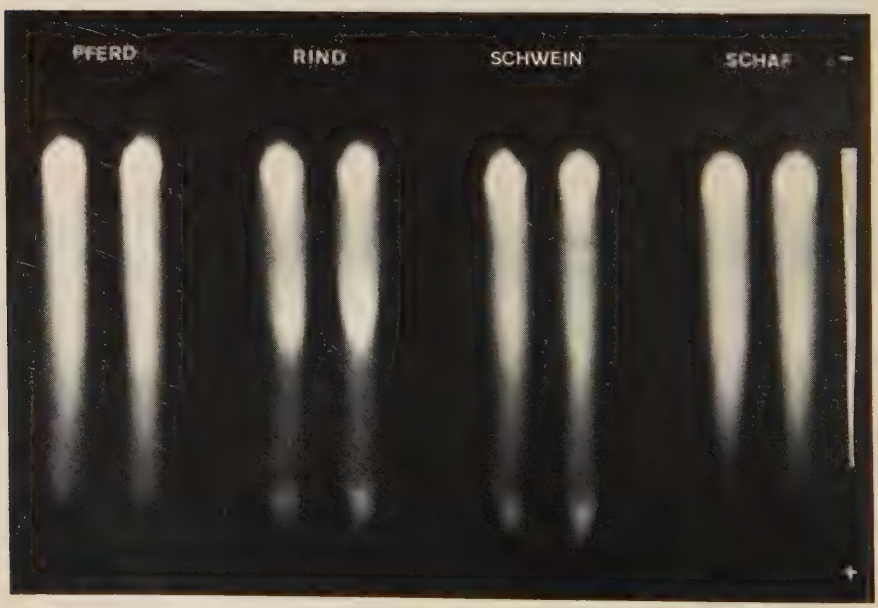


Abbildung 6

0,25 ng ^{131}J-Schweine-Insulin + 300 ng Insulin verschiedener Spezies + 12,5 µg Rinder-Albumin

Abbildung 7

0,25 ng ^{131}J-Schweine-Insulin + 2,5 µg Insulin verschiedener Spezies + 12,5 µg Rinder-Albumin (SI)

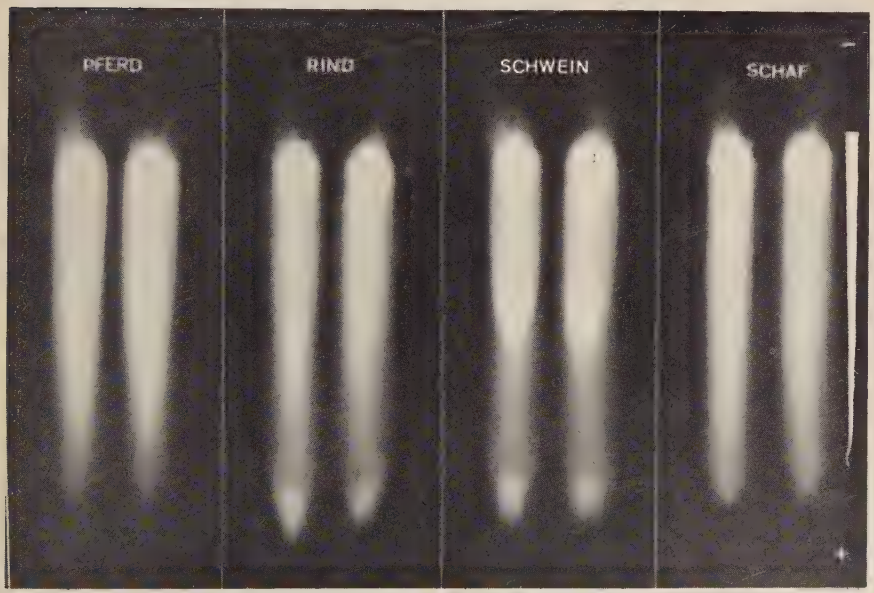
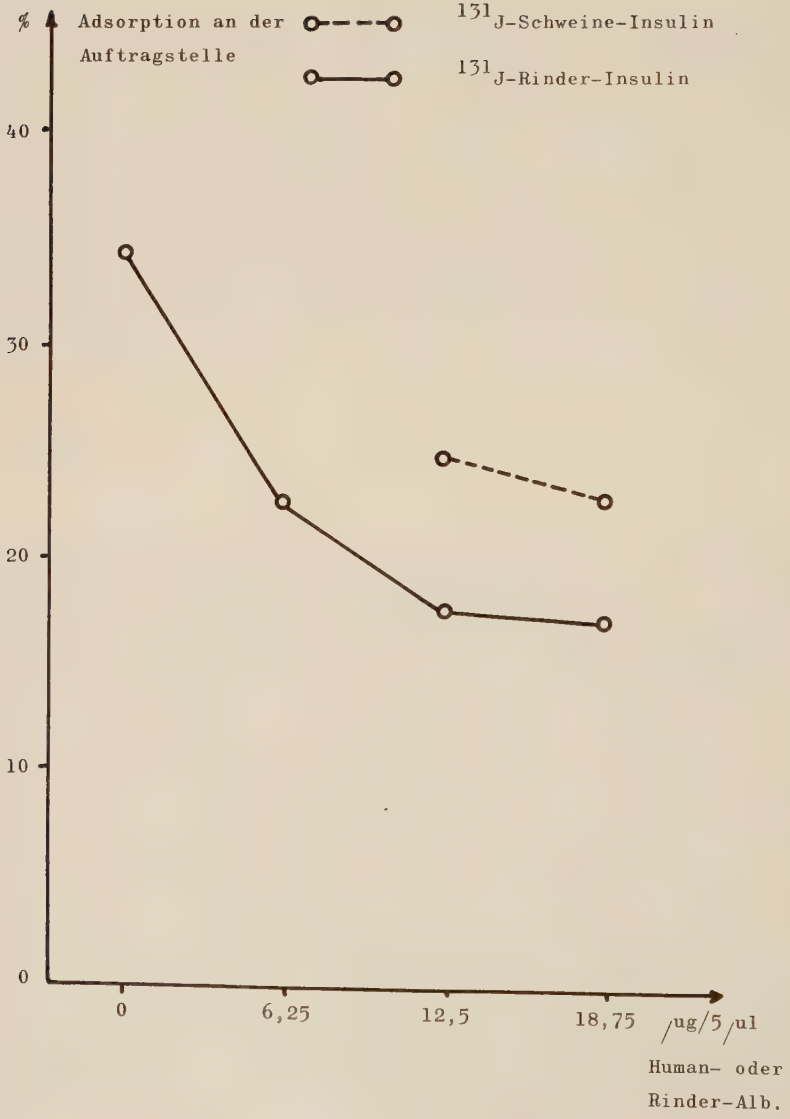


Abbildung 8


%
Adsorption an der Auftragstelle
131J-Schweine-Insulin
131J-Rinder-Insulin
40
30
20
10
0
0
6,25
12,5
18,75
/ug/5/ul
Human- oder Rinder-Alb.

TABELLEN

Die Zahlen geben die an der Auftragstelle adsorbierte ^{131}J-Insulin-Radioaktivität in % der Gesamtradioaktivität an.

Tabelle 1: Versuchsreihe RI

Insuline		Pferd	Rind	Schwein	Schaf
Versuchsgruppe	1	36	35	35	35
	2	32	33	32	32
	3	36	36	35	36
	4	35	33	33	33
	5	36	36	35	36
	$\bar{x}$	35	34,6	34	34,4

Tabelle 2: Versuchsreihe RI-HA

Versuchsgruppe	1	22	21	21	22
	2	19	18	17	19
	3	23	23	23	23
	4	20	22	21	22
	5	24	23	25	24
	$\bar{x}$	21,6	21,4	21,4	22

Tabelle 3: Versuchsreihe RI-RA

Versuchsgruppe	1	23	25	25	25
	2	23	23	22	23
	3	25	25	25	24
	4	22	23	23	23
	5	24	24	23	24
	$\bar{x}$	23,4	24	23,6	23,8

Tabelle 4: Versuchsreihe RI-HG

Insuline		Pferd	Rind	Schwein	Schaf
Versuchsgruppe	1	34	35	35	35
	2	29	30	30	30
	3	36	36	35	35
	4	33	33	33	33
	5	35	35	35	35
	$\bar{x}$	33,4	33,8	33,6	33,6

Tabelle 5: Versuchsreihe RI-RG

Versuchsgruppe	1	36	36	36	36
	2	30	31	31	31
	3	36	35	36	35
	4	34	34	34	34
	5	36	35	36	36
	$\bar{x}$	34,4	34,2	34,6	34,4

Tabelle 6: Versuchsreihe RI-5

Versuchsgruppe	1	19	18	17	18
	2	17	18	18	19
	3	18	18	17	18
	4	18	16	17	17
	5	18	18	18	17
	$\bar{x}$	18	17,6	17,4	17,8

Tabelle 7: Versuchsreihe RI-75

Insuline		Pferd	Rind	Schwein	Schaf
Versuchsgruppe	1	17	19	17	17
	2	19	19	19	19
	3	17	16	16	16
	4	16	17	17	17
	5	17	17	16	17
	$\bar{x}$	17,2	17,4	17,0	17,2

Tabelle 8: Versuchsreihe SI

Versuchsgruppe	1	24	24	25	25
	2	25	24	26	26
	3	27	26	26	26
	4	23	22	22	22
	5	25	26	25	26
	$\bar{x}$	24,8	24,4	24,8	25

Tabelle 9: Versuchsreihe SI-HA

Versuchsgruppe	1	21	22	23	23
	2	26	26	25	26
	3	26	27	26	26
	4	20	20	21	20
	5	21	22	20	21
	$\bar{x}$	22,8	23,4	23,0	23,2

Tabelle 10: Versuchsreihe SI-RA

Insuline		Pferd	Rind	Schwein	Schaf
Versuchsgruppe	1	22	22	21	21
	2	22	23	23	24
	3	27	26	25	25
	4	23	22	20	21
	5	22	21	21	22
	$\bar{x}$	23,2	22,8	22	22,6

Tabelle 11: Versuchsreihe SI-HG

Versuchsgruppe	1	25	25	24	25
	2	26	24	25	25
	3	28	28	27	28
	4	21	21	21	21
	5	26	25	25	26
	$\bar{x}$	25,2	24,6	24,4	25

Tabelle 12: Versuchsreihe SI-RG

Versuchsgruppe	1	26	26	27	25
	2	25	27	26	26
	3	29	26	26	29
	4	21	22	22	22
	5	24	22	24	25
	$\bar{x}$	25	24,6	25	25,4

Tabelle 13: Mittelwerte der Versuchsreihen

Versuchs-reihen	$\bar{x}$	Human- oder Rinder-Albumin (/ug/5/ul)	Human- oder Rinder-γ-Globulin (/ug/5/ul)
RI	34,5 %	-	-
RI-HA	21,6 %	6,25	-
RI-RA	23,7 %	6,25	-
RI-HA + RA	22,7 %	6,25	-
RI-HG	33,9 %	-	6,25
RI-RG	34,4 %	-	6,25
RI-HG + RG	34,2 %	-	6,25
RI-5	17,7 %	12,50	-
RI-75	17,2 %	18,75	-
SI	24,8 %	12,50	-
SI-HA	23,1 %	18,75	-
SI-RA	22,7 %	18,75	-
SI-HA + RA	22,9 %	18,75	-
SI-HG	24,8 %	12,50	6,25
SI-RG	25,0 %	12,50	6,25
SI-HG + RG	24,9 %	12,50	6,25

STATISTIK

Die statistische Auswertung erfolgte im Rahmen einer Varianzanalyse durch das Rechenzentrum der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Tübingen (Leiter: Prof. Dr. E. Schmid).
Herrn Priv.-Doz. Dr. Winne (Pharmakologisches Institut Tübingen) und Herrn Dipl.-Math. Schubring (Rechenzentrum) möchte ich an dieser Stelle für die freundliche Hilfe aufrichtig danken.

1. Versuche mit ^{131}J-Rinder-Insulin

Quelle der Variation		
Zwischen den Insulinen	$F_{3,48} = 0,51$	$P > 0,05$
Zwischen Alb. und γ-Glob.	$F_{4,16} = 51,76$	$P < 0,01$
Wechselwirkg. Insulin/Eiweisse	$F_{12,48} = 1,14$	$P > 0,05$
Wechselw. Eiw./Wiederholung	$F_{16,48} = 0,42$	$P > 0,05$

2. Versuche mit ^{131}J-Schweine-Insulin

Quelle der Variation		
Zwischen den Insulinen	$F_{3,48} = 1,27$	$P > 0,05$
Zwischen Alb. und γ-Glob.	$F_{4,16} = 26,00$	$P < 0,01$
Wechselwirkg. Insulin/Eiweisse	$F_{12,48} = 0,76$	$P > 0,05$
Wechselw. Eiw./Wiederholung	$F_{16,48} = 1.65$	$P > 0,05$

3. Vergleiche zwischen den beiden Hauptversuchen

Da jeder der beiden Hauptversuche für sich allein einer Varianzanalyse unterworfen wurde, mußten Vergleiche zwischen den Hauptversuchen durch t-Teste abgesichert werden.

Vergleich von RI-5 mit SI :	$t = 17,28$	$P < 0,01$
Vergleich von RI-75 mit SI-HA/RA:	$t = 9,12$	$P < 0,01$

DISKUSSION

Homologe und heterologe Insuline führen - auch in chemisch reiner Form - beim Menschen und Tier zur Produktion von Antikörpern (PFEIFFER, 1969). Beim Nachweis der Insulin-Antikörper durch die verschiedensten Verfahren treten Kreuzreaktionen auf zwischen Antikörpern und Insulinen, mit denen der Organismus noch nie in Berührung gekommen ist.

Die Ursachen für das immunologische Verhalten von homologen und heterologen Insulinen einerseits, und die unterschiedliche Reaktion der einzelnen Organismen auf die Insulin-Antigene andererseits, sind noch nicht vollständig geklärt. Eine wesentliche Ursache ist aber darin zu suchen, daß Proteine gleicher Primärstruktur unterschiedliche Tertiärstrukturen besitzen können, und daß die antigenen Determinanten eng an die Tertiärstruktur gebunden sind (SCHWICK, 1966).

Die räumliche Struktur ist aber auch, neben Löslichkeit, Polymerisationsgrad und Ladung, für die Adsorption von grosser Bedeutung (NETTER, 1959). Nach den heute üblichen Vorstellungen kann die Antigen-Antikörper-Reaktion als eine mehr oder weniger spezifische Form der Adsorption angesehen werden. Ob auch die primäre immunologische Reaktion von Organismen gegenüber antigenen Reizen einen neuinduzierten Adsorptionsvorgang darstellt, ist nicht bekannt, aber durchaus möglich.

Mit den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Methoden war es nicht möglich, ein unterschiedliches Adsorptionsver-

mögen von Elektrophoresepapier für Insuline verschiedener Spezies nachzuweisen, das immunologischen Spezifitäten entsprechen könnte. Dies ist um so erstaunlicher, als - wie aus den unterschiedlichen Adsorptionsmustern der gewanderten ^{131}J-Insuline ersichtlich - die nichtmarkierten Insuline aus verschiedenen Fraktionen bestehen. Diese Befunde lassen sich jedoch gut vereinbaren mit rein physiko-chemischen Heterogenitäten verschiedener Insuline. Diese Heterogenitäten haben aber mit immunologischen Speziesunterschieden wahrscheinlich nichts zu tun. MIRSKY und KAWAMURA haben nämlich 1966 mit Hilfe der Polyacrylamidgel-Elektrophorese die einzelnen Komponenten von 11 Insulinen verschiedener Spezies miteinander verglichen. Sie konnten nachweisen, daß die elektrophoretisch dargestellten Haupt- und Nebenkomponenten der einzelnen Insuline Ausdruck von Unterschieden in der Tertiärstruktur sind. Die einzelnen Fraktionen eines Insulins wandern vermutlich auf Grund von Unterschieden in der Primär- und Tertiärstruktur verschieden weit.

Der Anteil der schneller als die Hauptkomponenten wandernden Nebenkomponenten ist bei Rinder- und Schweine-Insulin größer als bei Pferde- und Schaf-Insulin (MIRSKY und KAWAMURA, 1966). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte festgestellt werden, daß die von Rinder- und Schweine-Insulin desorbierten ^{131}J-Insuline weiter wandern als die durch Pferde- und Schaf-Insulin desorbierten Radiojodinsuline.

Außer den Unterschieden im Bereich der Nebenkomponenten bestehen auch Unterschiede zwischen den Hauptkomponenten der vier Insuline. Zwar wandern die Hauptkomponenten der einzelnen Insuline annähernd gleich weit, doch bestehen Unterschiede im Anteil der Hauptkomponenten an der untersuchten Insulinmenge. Allerdings haben MIRSKY und KAWAMURA keine exakten An-

gaben über die absoluten oder relativen Anteile der Hauptkomponenten an der untersuchten Insulinmenge gemacht. Lägen die Unterschiede im Insulingehalt der Hauptkomponenten der einzelnen Insuline für die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungsbedingungen in der Größenordnung um 300 ng pro Auftragstelle, dann müßten die verschiedenen Insuline das jeweilige ^{131}J-Insulin unterschiedlich stark von der Auftragstelle desorbieren. Die Unterschiede zwischen den Insulinen verschiedener Spezies scheinen sich aber bei der Papierelektrophorese nur auf die ohnehin wanderungsbereiteren Anteile des ^{131}J-Insulins auszuwirken. Um diese feinen Unterschiede exakt festzustellen, wäre allerdings ein Radiopapierchromatograph mit einem höheren Auflösungsvermögen erforderlich. Das hier verwendete Gerät läßt in Verbindung mit Papierstreifen, die nach der Trocknung stets etwas deformiert sind, je nach Impulsrate nur eine Reproduzierbarkeit mit einer Fehlerbreite von ca. $\pm$ 5 - 10 % zu. Immerhin lassen sich mit der Papierelektrophorese, wenn auch nicht mit gleicher Vielfalt wie bei der Polyacrylamidgel-Elektrophorese, gewisse Adsorptionsunterschiede feststellen. Diese sind auf Autoradiogrammen besser zu erkennen als quantitativ mit dem Radiopapierchromatographen zu messen. Jedoch können sich die auf Papier und Polyacrylamidgel beobachteten Unterschiede nicht mit den von BERSON und YALOW (1959) immunologisch bestimmten Speziesdifferenzen messen.

ZUSAMMENFASSUNG

^{131}J-markierte Insuline vom Rind und Schwein in Nanogramm-Mengen wurden mit Mikrogramm-Mengen nichtradioaktiver Insuline vom Pferd, Rind, Schwein und Schaf sowie Albuminen und γ-Globulinen vom Menschen und Rind gemischt und der Papierelektrophorese unterworfen. Diese Zusätze wirkten sich auf die Wanderstrecke der ^{131}J-Insuline und deren autoradiographisches Verteilungsmuster verschiedenartig aus.

I. Versuche mit ^{131}J-Rinder-Insulin

1. Die Konzentration der nichtmarkierten Insuline muß ungefähr 150 ng pro Auftragstelle betragen, um von 7,5 ng radioaktiven Rinder-Insulins einen geringen Teil aus der Adsorption an der Auftragstelle zu verdrängen.

2. Wird die Konzentration der nichtmarkierten Insuline auf 2,5 µg pro Auftragstelle erhöht, so wird durchschnittlich ein Drittel des adsorbierten ^{131}J-Rinder-Insulins nicht verdrängt; dabei lassen sich keine Unterschiede zwischen den vier Insulinen nachweisen.

3. Obwohl der Desorptionseffekt der Tierinsuline etwa gleich stark ist, lassen sich deutliche Unterschiede im Adsorptionsmuster des gewanderten ^{131}J-Rinder-Insulins feststellen: Insuline vom Rind und Schwein wandern bei gleichen Konzentrationen weiter als Insuline vom Pferd und Schaf.

4. Bei Zugabe von Albuminen und γ-Globulinen vom Menschen und Rind ergibt sich folgendes:
   a) Es ließen sich zwischen Human-Albumin und Rinder-Albumin keine Speziesunterschiede nachweisen, was die Adsorption von Insulinen angeht.
   b) γ-Globuline haben keinen Einfluß auf die Adsorption radiojodierten Rinder-Insulins.
   c) Die Adsorption von ^{131}J-Rinder-Insulin an der Auftragstelle ist abhängig von der Albuminkonzentration: ein Zusatz von 0,125 % Albumin zu Insulinlösungen vermindert die Adsorption von Insulin um durchschnittlich 12 %, bei 0,25 % Albumin beträgt der Wert ca. 17 % und bei 0,375 % Albumin ca. 18 %.

5. Unter Albuminzugabe wandert ein Teil des radiojodierten Rinder-Insulins in die Gegend der Albuminbande. Dieser Anteil ist bei Rinder- und Schweine-Insulin größer als bei Pferde- und Schaf-Insulin.

II. Versuche mit ^{131}J-Schweine-Insulin

^{131}J-Schweine-Insulin wurde schon vom Hersteller mit einem Zusatz von 0,5 % Rinder-Albumin geliefert. Aus diesem Grunde konnte die Adsorption von ^{131}J-Schweine-Insulin unter dem alleinigen Einfluß von Insulinen verschiedener Spezies nicht untersucht werden.

1. Trotz eines relativ hohen Albumingehaltes von 0,25 % in den 1:1 verdünnten Ansätzen verhält sich ^{131}J-Schweine-Insulin ähnlich wie ^{131}J-Rinder-Insulin, indem bei Zusatz von 300 ng nichtradioaktiven Insulins pro Auftragstelle nur ein geringer Teil desorbiert wird.

2. Wird die Konzentration der Tierinsuline erhöht auf 2,5 µg pro Auftragstelle, so werden durchschnittlich drei Viertel des radiojodierten Schweine-Insulins desorbiert, und zwar durch alle Tierinsuline gleich stark.

3. Bei Albuminen vom Menschen und Rind lassen sich keine Speziesunterschiede nachweisen, was die Adsorption von Insulin betrifft.

4. γ-Globuline beeinflussen die Adsorption von ^{131}J-Schweine-Insulin an Zellulose nicht.

5. Die Erhöhung der Albumin-Konzentration um 0,125 % auf 0,375 % vermindert die Adsorption von radiojodiertem Schweine-Insulin nur geringgradig.

6. Die durch nichtmarkiertes Insulin vom Rind und Schwein desorbierten und mit Albumin wandernden Anteile von ^{131}J-Schweine-Insulin sind größer als die durch Pferde- und Schaf-Insulin desorbierten.

III. Zwischen den Adsorptionsmustern von desorbiertem ^{131}J-Schweine- und ^{131}J-Rinder-Insulin war bei gleichen Albuminkonzentrationen kein Unterschied festzustellen.

IV. Die Unterschiede der Adsorptionsmuster der Insuline verschiedener Spezies beruhen vermutlich nur auf unterschiedlichen physiko-chemischen Eigenschaften.

LITERATUR

ARQUILLA, E. R.
Immunological studies of insulin.
Ciba Foundation. Coll. on Endocrinology,
Hrsg.: P. CAMERON and M. O'CONNOR,
14, 146-165, 1962

ARQUILLA, E. R. and J. FINN
Insulin antibody variations in rabbits and guinea pigs and multiple antigenetic determinants of insulin.
J. Exp. Med. 118, 55-63, 1963

BANTING, F. G., and W. R. FRANKS and S. GAIRNS
Anti-insulin activity of serum of insulin-treated patients.
Amer. J. Psychiat. 95, 562-565, 1938

BERSON, S. A., R. S. YALOW, A. BAUMAN, M. A. ROTHSCHILD, K. NEWERLY
Insulin-^{131}J metabolism in human subjects: Demonstration of insulin binding globulin in the circulation of insulin treated subjects.
J. Clin. Invest. 35, 170-190, 1956

BERSON, S. A., R. S. YALOW
Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin-binding antibody.
J. Clin. Invest. 38, 1996-2016, 1959

BERSON, S. A., R. S. YALOW
Species-specificity of human anti-beef, pork insulin-serum.
J. Clin. Invest. 38, 2017-2025, 1959

BOLINGER, R. E.
Electrophoretic separation of insulin activity of normal plasma and plasma with added insulin-^{131}J.
Metabolism 8, 39-43, 1959

BRUNFELDT, K. and T. DECKERT
The antigenetic properties of pig insulin.
Acta Endocr. (Kbh.) 47, 353-366, 1964

BURROWS, B. A., T. PETERS and F. C. LOWELL
Physical binding of insulin by globulins of insulin-resistant subjects.
J. Clin. Invest. 36, 393-397, 1957

CUNNINGHAM, L. W., R. L. FISCHER, C. S. VESTLING
A study of the binding of zinc and cobalt by insulin.
J. Amer. Chem. Soc. 77, 5703-5707, 1955

DECKERT, T.
Insulin antibodies.
Munksgaard Verlag, Copenhagen, 1964, 22-155

FEDERLIN, K., G. HEINEMANN, I. GIGLI und H. DITSCHUNEIT
Antigenbindung durch zirkulierende Leukozyten bei de verzögerten lokalen Insulinallergie.
Deutsch. Med. Wschr. 91, 814-819, 1966

GRIMMINGER, H. und E. KALLEE
Die Inselzellhormone: Der Abbau von Insulin.
Handbuch des Diabetes mellitus, Band I, 257-280,
Hrsg.: E. F. PFEIFFER und Gen.,
J. F. Lehmanns Verlag München, 1969

GRODSKY, G. M. and P. H. FORSHAM
An immunochemical assay of total extractable insulin in man.
J. Clin. Invest. 39, 1070-1079, 1960

HALL, J. L.
Moving boundary electrophoretic study of insulin.
J. Biol. Chem. 139, 175-184, 1941

HARFENIST, E. J. and L. C. CRAIG
Countercurrent distribution studies with insulin.
J. Amer. Chem. Soc. 74, 3083-3087, 1952

HEISKELL, C. L., W. H. FLORSHEIM, L. MEISTER
Electrophoretic distribution of allergenic and hormonal fractions of commercial insulin.
Diabetes 8, 388-391, 1959

KALLEE, E.
Über ^{131}J-signiertes Insulin, I. Mitteilung (Nachweis).
Z. Naturforsch. 7b, 661-663, 1952

KALLEE, E.
Über ^{131}J-signiertes Insulin, II. Mitteilung (Anwendungsbereich und Grenzen der Nachweismethode).
Klin. Wschr. 32, 508-509, 1954

KALLEE, E. und G. SEYBOLD
Über ^{131}J-signiertes Insulin, III. Mitteilung (Verteilung im Rattenorganismus).
Z. Naturforsch. 9b, 307-311, 1954

KALLEE, E.
Die Bedeutung der Radioisotope für papierelektrophoretische und immunelektrophoretische Untersuchungen.
11. Jahreskongress für Laboratoriumsmedizin, 1965
Erg. Laborator. Med. 3, 109, 1967

KALLEE, E.
Die Inselzellhormone: Radiojodiertes Insulin.
Handbuch des Diabetes mellitus, Band I, 247-255,
Hrsg.: E. F. PFEIFFER und Gen.,
J. F. Lehmanns Verlag München, 1969

KERP, L., S. STEINHILBER und H. KASEMIR
Ein Verfahren zum Nachweis insulinbindender Antikörper durch Differentialadsorption.
Klin. Wschr. 44, 560-567, 1966

KERP, L., H. KASEMIR, F. KIELING
Insulinbindende Antikörper und Insulinbedarf bei Diabetikern.
Klin. Wschr. 46, 367-373, 1968

LOCKWOOD, D. H. and T. E. PROUT
Isoantibodies to insulin.
Clin. Res. 10, 401-407, 1962

MELANI, F., H. DITSCHUNEIT, K. M. BARTELT, H. FRIEDRICH und E. F. PFEIFFER
Über die radioimmunologische Bestimmung von Insulin im Blut.
Klin. Wschr. 43, 1000-1007, 1965

MIRSKY, A. und K. KAWAMURA
Heterogeneity of crystalline insulin.
Endocrinology 78, 1115-1119, 1966

MORCOS, R. H., S. ABD EL NABY, H. DITSCHUNEIT und E. F. PFEIFFER
Über die Ursache der Insulinresistenz bei der Insulinschocktherapie in der Psychiatrie.
Med. Klin. 60, 1073-1078, 1965

NETTER, H.
Theoretische Biochemie.
Springer-Verlag Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1959, S. 224-680

PETERS, T., BURROWS, B. A. und F. C. LOWELL
Physical binding of insulin gammaglobulins from insulin-resistant subjects.
Federation Proc.(Abstr.) 608, 1959

PFEIFFER, E. F.
Die Immunologie des Insulins.
12. Symp. Dtsch. Ges. f. Endokrinol., Wiesbaden 1966
Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1967
S. 26-39

PFEIFFER, E. F., H. DITSCHUNEIT und K. FEDERLIN
Die Immunologie des Insulins.
Handbuch des Diabetes mellitus, Band I, 155-201,
Hrsg.: E. F. PFEIFFER und Gen.,
J. F. Lehmanns Verlag München, 1969

RENOLD, A. E., J. STEINKE, J. S. SOELDNER, R. E. SMITH und H. N. ANTONIADES
Immunologic response of heifers to the administration of porcine and bovine (homologous) insulin.
J. Clin. Invest. 42, 969-970, 1963

SCHWICK, H. G.
Zur Immunologie des Insulins.
Behringwerk-Mitteilungen 46, 87-106, 1966

SCOTT, G. W., T. E. PROUT, I. A. WEAVER und S. P. ASPER
A comparison of the behaviour of insulin and insulin labeled with J^{131} in serum.
Diabetes 7, 38-45, 1958

SUNDBY, F.
Separation and charakterization of acid-induced insulin transformation products by paper electrophoresis in 7 m urea.
J. Ciol. Chem. 237, 3406-3411, 1962

TIMASCHEFF, S. N., R. A. BROWNS und J. G. KIRKWOOD
The fractionation of insulin by electrophoresis-convection.
J. Amer. Chem. Soc. 75, 3121-3124, 1953

Herrn Professor Dr. E. Kallee möchte ich für das Thema und die freundliche Anleitung zu dieser Arbeit herzlich danken.

Lebenslauf

Am 28. August 1942 wurde ich, Bernd Manfred Müller, als Sohn des Kernmachers Wilhelm Müller und seiner Frau Else, geb. Göbel, in Reutlingen geboren. Ich besuchte die Volksschule und die Wirtschaftsoberschule in Reutlingen, wo ich im Frühjahr 1962 die Reifeprüfung ablegte. Anschließend begann ich an der Universität Tübingen mit dem Medizinstudium. Im Helbst 1963 bestand ich dort die Naturwissenschaftliche und im Herbst 1965 die Ärztliche Vorprüfung. Nach dem Studium von sechs klinischen Semestern, davon das zweite an der Universität Hamburg, bestand ich am 13. Februar 1969 in Tübingen das Medizinische Staatsexamen.